

Código: UMSS-DICYT-DCA-2017-EC0013



Cuantificación de *esteviósido* y *rebaudiosido A* por HPLC en hojas y purificados de Stevia



INVESTIGADOR: Sonia Torrico Vallejos

UNIDAD: Instituto de Investigaciones de la Fac. de Ciencias y Tecnología

CENTRO/LABORATORIO: Centro de Tecnología Agroindustrial (CTA)

RESUMEN

La UMSS a través del Centro de Tecnología Agroindustrial (CTA), ha estandarizado un método analítico para la cuantificación de esteviósido y rebaudiosido A por cromatografía HPLC en hojas de la planta stevia rebaudiana Bertoni y purificados del mismo, usada como edulcorante natural sustituto del azúcar. Este método es el recomendado en la norma boliviana y la FAO a través de su comité de expertos en alimentos, JECFA (2008). La estandarización tomó parámetros como linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad, repetitividad y exactitud del método.

ABSTRACT

The UMSS, through the Agroindustrial Technology Center (CTA), has standardized an analytical method for the quantification of stevioside and rebaudioside A by HPLC chromatography in leaves of the stevia rebaudiana Bertoni plant and purified from it, used as a natural sugar substitute sweetener. This method is recommended in the Bolivian regulation and the FAO through its committee of food experts, JECFA (2008). Standardization took parameters such as linearity, detection limit, quantification limit, reproducibility, repeatability, and method accuracy.

Descripción y características fundamentales

Las hojas de Stevia contienen glicósidos de los cuales muchos estudios ya han reportado la actividad biológica y su capacidad edulcorante. Dentro de los mismos los más abundantes son el esteviósido y el rebaudiósido A, para los cuales no se cuenta con métodos estandarizados para cuantificarlos en laboratorios de nuestro país.

El método cromatográfico de HPLC se validó usando una columna Ultra Amino 5µm de 250 x 4.6 mm equipado con detector de Arreglo de Diodos SPD-M20A ajustado a 210 nm de λ. La fase móvil consistió de 80:20 (v/v) de acetonitrilo y agua, ajuste a una velocidad de 1,0 ml/min de caudal y modo isocrático.

Los parámetros calculados fueron: curvas de calibración de esteviósido y rebaudiósido A, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de esteviósido y rebaudiósido A, respectivamente; linealidad (de esteviósido y rebaudiósido A), precisión (repetibilidad del equipo, del método y repetibilidad intermedia), precisión por analito (de esteviósido y rebaudiósido A), y exactitud (por recuperación de analito).

Las curvas de calibración fueron lineales en el rango de trabajo (20 - 100 ppm), con coeficiente de correlación y determinación ≥ 0.999 para ESTEVIÓSIDO y (20 - 100 ppm) con coeficiente de correlación y determinación ≥ 0.999 para REBAUDIÓSIDO A.

El límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) calculados para esteviósido y rebaudiósido A: 2,9 y 10 ppm para el primero y 1,2 y 4 ppm para el segundo.

La linealidad para esteviósido es significativa entre los valores de referencia y la respuesta del método, siendo el intervalo lineal entre 20 a 100 ppm. Para rebaudiósido A, la linealidad calculada según Quattrocchi es de 66.12 y el tabulado es de 3.182, asumiéndose que si $t_r > t_{tab}$ existe una buena correlación lineal en el rango de 20 a 100 ppm.

Los resultados de precisión para esteviósido y rebaudiósido A, respectivamente dan covarianzas de 5.26 y 13.49 %, considerándose que para el primero el método es preciso y que para el rebaudiósido A se tiene una precisión aceptable. El porcentaje de recuperación de muestras enriquecidas fueron a 3 niveles de concentración $93.93\% \pm 10.4\%$ para esteviósido y $95.1\% \pm 11.1\%$ para rebaudiósido A.

Aspectos innovadores

La novedad del presente conocimiento radica en el hecho de que en Bolivia no existen laboratorios que presten servicios de cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A (componentes mayoritarios de las hojas de stevia) por HPLC. En el laboratorio del CTA, se ha estandarizado el método de análisis que está acorde a lo estipulado en la Norma Boliviana (IBNORCA) y va en consonancia con el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios, JECFA para cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en hojas.

Los criterios de validación del método ofertado mostraron precisión, linealidad, LD, LC y recuperación adecuados, por lo tanto, el método es adecuado para el análisis cuantitativo de esteviósido y rebaudiósido A de la stevia rebaudiana Bertoni y el método satisface la condición de exactitud al 95% de confianza en los

análisis reportados para muestras de hojas de stevia en general.

Ventajas competitivas

Para los productores de stevia, se incrementaría el valor de su producto con un análisis de cuantificación, ya que el mismo evalúa el contenido de dulzor de las hojas; asimismo ayuda al control de sus cultivos en cuanto a labores culturales, ya que el contenido de edulcorante varía de acuerdo a las condiciones de cuidado del terreno y del cultivo mismo; en cuanto a la producción orgánica de hojas de stevia para exportación, es de vital importancia un análisis de cuantificación de los dos principales componentes de la misma, sin la cual el productor no podrá exportar su producto. Otra gran ventaja para los empresarios es la competitividad de sus productos (purificados en base a stevia) en el mercado local, regional y para exportación.

Tipo de asociación que busca

Se busca generar colaboración con organizaciones productoras de stevia y otros organismos que puedan incorporar en su rutina de control la cuantificación de los dos principales componentes de hojas de stevia y/o de productos purificados en base a ella, es así que se plantea que SENASAG como organismo de control gubernamental de inocuidad alimentaria haga un seguimiento especial a productos purificados en base a stevia de venta libre en el país. Las actividades concretas que deben realizar las organizaciones es; gestionar cartas de intenciones de sus respectivas organizaciones para cubrir costos de solamente materiales e insumos necesarios para cuantificar sus productos, como un ejercicio de interacción social UMSS-sociedad en caso de asociaciones de agricultores. Pero en el caso de empresas el costo deberá cubrir además mantenimiento de equipos, depreciación de activos, etc.

Si la organización pretende incorporar este desarrollo tecnológico el costo de equipamiento es de aproximadamente 45 000.00 \$us, suministros y solventes para unas 50 muestras 3 000.00 \$us y costo de personal capacitado al menos 1 000.00 \$us/mes.

SENASAG (a nivel nacional) sería la organización en la cual encajaría esta oferta de conocimiento

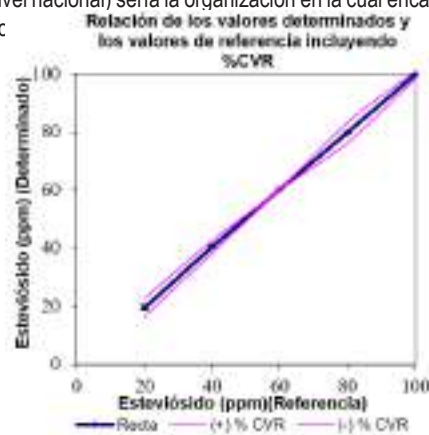


Ilustración EC13: Relación gráfica | Sonia Torrico



Proyecto: Zonificación de cultivos orgánicos de stevia en Bolivia. Estudio de zonas productoras y caracterización del contenido de glicósidos de esteviol por HPLC.

Otras unidades de investigación:

- Centro de Alimentos y Productos Naturales (CAPN)

Organizaciones asociadas al proyecto:

- Productores Organicos de Stevia Asociados (POSTA)